

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/096978 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C08H 1/06, C08L 89/06, A61L 27/22
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05275
- (22) 国際出願日: 2002 年 5 月 30 日 (30.05.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-163505 2001 年 5 月 30 日 (30.05.2001) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 宮本 啓一 (MIYAMOTO, Keiichi) [JP/JP]; 〒  
514-1114 三重県 久居市 井戸山町 1 4 5 久居東住宅  
5-4 0 1 Mie (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, IIR, IU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (74) 代理人: 高木 千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒  
102-0083 東京都 千代田区 麹町一丁目 1 0 番地 麹町  
広洋ビル Tokyo (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CROSSLINKED ELASTIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: エラスチン架橋体およびその製造方法

(57) Abstract: Crosslinked elastin; a water soluble crosslinking agent to be used in the crosslinking; molded elastin articles; medical instruments and regeneration tissues using the crosslinked elastin; and a surgical therapy and a regeneration therapy with the use of these medical instruments. Thus, a biocompatible functional material having an elasticity appropriate for vital transplantation without causing release of cell-adhesive proteins is provided.

(57) 要約:

本発明は、エラスチン架橋体、架橋に使用する水溶性架橋剤、エラスチン成形体、エラスチン架橋体を用いた医療用器具および再生組織、該医療用器具を用いた外科治療方法および再生医療に関する。

本発明は、細胞接着性タンパク質の脱離が起こらず、生体移植に適合し得る弾性を有する生体適合性機能性材料を提供するものである。

WO 02/096978 A1

BEST AVAILABLE COPY

## 明細書

## エラスチン架橋体およびその製造方法

## 技術分野

5 本発明は、生体適合性機能性材料、およびその製造方法、医療用器具、架橋剤、外科治療方法、さらに再生組織に関する。

## 背景技術

10 事故、災害その他の理由で神経組織が切断された患者に対する治療方法の一つとして、人工材料によるチューブを神経欠損部に連結して、該チューブ内に神経組織の再生を誘導する方法が行われている。該チューブとしては、シリコン、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレンテフタレート、アルギン酸、ポリ乳酸等のチューブの内面を、コラーゲンやラミニンなどの細胞接着性タンパク質をコーティングしたものが用いられている。

15 また、血管が切断された患者に対する治療方法の一つとして、シリコン、ポリウレタン、ポリエステルなどの合成高分子繊維を編んだ布を管状とし、その内面をコラーゲンやラミニンなどの細胞接着性タンパク質をコーティングした人工血管を、血管切断部位に移植し、該人工血管内部に内皮細胞を誘導させる方法が行われている。

## 発明の開示

20 前述のシリコンチューブやポリウレタンチューブなどの内面は、細胞接着性がないためこれまでは、コラーゲンやラミニンなどの細胞接着性タンパク質をコーティングしたチューブや該人工血管を、前述のような治療方法に用いた場合には、長期の治療の間に該細胞接着性タンパク質が脱離し、神経や血管などの組織の再生が不十分であった。

25 さらに、動物内に移植するチューブや人工血管には、人体および各組織の動きに連動するだけの弾性が求められているが、シリコンやポリエステルを主原料とするチューブや人工血管のヤング率（弾性率）は、適応された組織のヤング率（弾性率）が  $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6 \text{ Pa}$  である

のに対し、 $1 \times 10^7 \text{ Pa}$ 以上であるため、接合部に強いストレスが起  
こり、その結果、血栓が生じるなどの問題を抱えており、人体の組織と  
同じ弾性を有する材料が求められていた。

5 本発明者は前述の従来技術の課題に鑑み鋭意研究を重ねた結果、水溶  
性エラスチンを架橋剤により架橋することにより、コーティングしたコ  
ラーゲンやラミニン等の細胞接着性タンパク質の脱離が起こらず、生体  
の移植に適合し得るだけの弾性を有するエラスチン架橋体を得ることが  
できることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明は下記の構成を有する。

- 10 (1) 水溶性エラスチンから選ばれた1種以上を含有する架橋原料が、  
水溶性架橋剤で架橋されてなるエラスチン架橋体。
- 15 (2) 架橋原料がさらにコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フ  
ィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビ  
ンであるタンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリ  
15 アミノ酸、ポリガラクトクチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫  
酸、ヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキスト  
ラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、デキストラン、カル  
ボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガ  
20 ントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギ  
ーナン、寒天、キサントガム、カードラン、フルラン、セルロ  
ース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロー  
ス、大豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシ  
25 ログルカン、レンチナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増  
殖因子)、TGF- $\alpha$  (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、  
VEGF (血管内皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子)である  
細胞増殖因子、ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサ  
ン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、  
ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、

ポリカプロラクトン、ポリプロピレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、およびポリリンゴ酸から選ばれた1種以上を含有する(1)記載のエラスチン架橋体。

5 (3) 水溶性エラスチンの含有率が0.5~99.5重量%の範囲である(1)記載のエラスチン架橋体。

(4) ヤング率が $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$  Paの範囲である(1)記載のエラスチン架橋体。

10 (5) 内部構造が空隙を有するスポンジ構造である(1)記載のエラスチン架橋体。

(6) 空隙の平均直径が20  $\mu$ m未満の範囲である(5)記載のエラスチン架橋体。

(7) 空隙の平均直径が20  $\mu$ m~2 mmの範囲である(5)記載のエラスチン架橋体。

15 (8) コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンであるタンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリアミノ酸、ポリガラクトチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セル  
20 ロース、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒天、キサンタンガム、カードラン、プルラン、セルロース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水溶性多糖、  
25 グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、レンチナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF- $\alpha$ (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF(上皮増殖因子)、VEGF(血管内皮増殖因子)、CTNF(毛様体神経栄養因子)である細胞増殖因子、ポリメ

タクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオ  
ロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタ  
レート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカプロラクトン、  
ポリプロピレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、ポリ  
エチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、およ  
びポリリンゴ酸から選ばれた 1 種以上が化学的に結合されてなる  
(1) または (2) 記載のエラスチン架橋体。

(9) 化学的結合が架橋剤を用いた架橋である (8) 記載のエラスチン  
架橋体。

(10) コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、  
ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンであるタ  
ンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリアミノ酸、  
ポリガラクトチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアル  
ロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、  
硫酸化セルロース、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチ  
ルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガントガム、  
ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒  
天、キサントガム、カードラン、プルラン、セルロース、デン  
ブリン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水  
溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、  
レンチナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF-  
 $\alpha$  (形質転換増殖因子  $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内  
皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子) である細胞増殖因子、  
ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラ  
フルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテ  
レフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカプロラク  
トン、ポリプロピレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、  
ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、

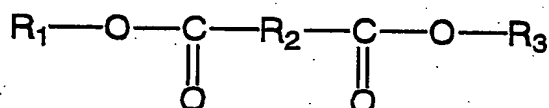
およびポリリンゴ酸から選ばれた 1 種以上を含有する (1)、  
(2) または (8) 記載のエラスチン架橋体。

(11) 水溶性架橋剤が分子中心領域に疎水性部を有し、両末端に  
アミノ基と反応する活性エステル基を有する水溶性化合物である

(1) 記載のエラスチン架橋体。

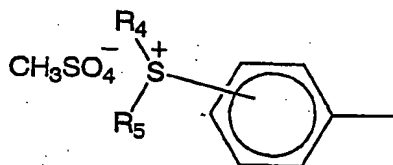
(12) 水溶性架橋剤が、下記一般式で表される水溶性化合物であ  
ることを特徴とする (1) 記載のエラスチン架橋体。

<一般式>



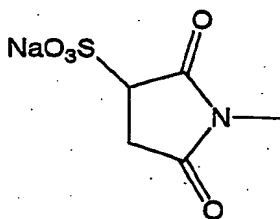
(R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>は下記の構造式で表される<A>または<B>の何れかで  
あり、R<sub>1</sub>とR<sub>3</sub>とは同じであっても異なってもよく、)

<A>



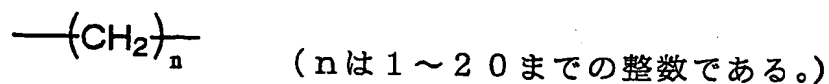
(R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>のいずれかであり、R<sub>4</sub>とR<sub>5</sub>とは同  
じであっても異なってもよい。)

<B>

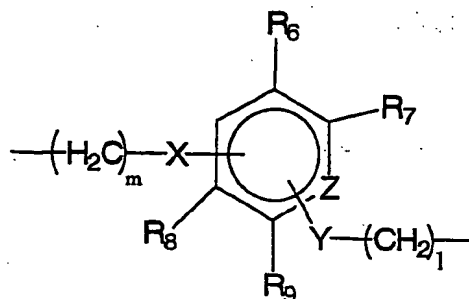


(R<sub>2</sub>は下記の構造式で表される<C>または<D>の何れかで表され  
る化合物であり、)

<C>



&lt;D&gt;



5 (m、l は 0 ~ 15 までの整数であり、X、Y は、CH<sub>2</sub> または O の何れかであり、X と Y とは同じであっても異なってもよく、Z は C または N の何れかであり、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub> は、H、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> の何れかであり、それぞれ同じであっても異なっても良い。)

10 (13) (1) ~ (12) の何れか 1 項記載のエラスチン架橋体からなるエラスチン成形体。

(14) 形状が、糸状、膜状、棒状、ペレット状またはチューブ状である (13) 記載のエラスチン成形体。

(15) (1) 記載のエラスチン架橋体を用いた医療用器具。

15 (16) (15) 記載の医療用器具を用いることを特徴とする外科治療方法。

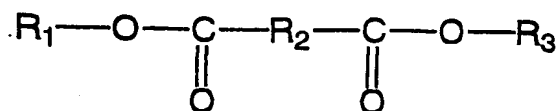
(17) (1) 記載のエラスチン架橋体、(15) 記載の医療用器具を用いることを特徴とする再生医療。

(18) (1) 記載のエラスチン架橋体を用いて得られた再生組織。

20 (19) 分子中心領域に疎水性部を有し、両末端にアミノ基と反応する活性エステル基を有する水溶性化合物を含有する架橋剤。

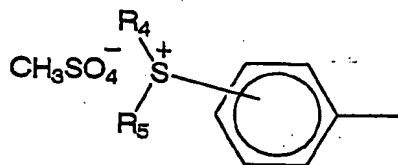
(20) 化合物が、下記一般式で表される化合物である (19) 記載の架橋剤。

&lt;一般式&gt;



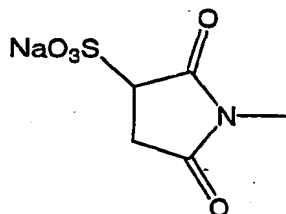
( $R_1$ 、 $R_3$ は下記の構造式で表される<A>または<B>の何れかであり、 $R_1$ と $R_3$ とは同じであっても異なってもよく、)

5 &lt;A&gt;



( $R_4$ 、 $R_5$ はH、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかであり、 $R_4$ と $R_5$ とは同じであっても異なってもよい。)

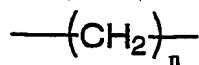
&lt;B&gt;



10

( $R_2$ は下記の構造式で表される<C>または<D>の何れかで表される化合物であり、)

&lt;C&gt;

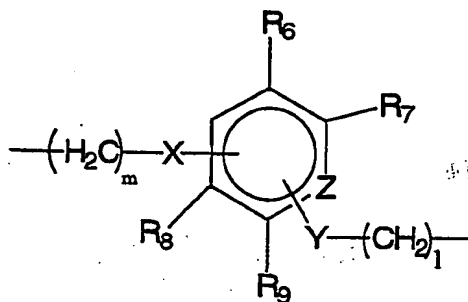


(nは1～20までの整数である。)

15

&lt;D&gt;





( $m$ 、 $l$ は0～15までの整数であり、 $X$ 、 $Y$ は、 $\text{CH}_2$ または $\text{O}$ の何れかであり、 $X$ と $Y$ とは同じであっても異なってもよく、 $Z$ は $\text{C}$ または $\text{N}$ の何れかであり、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ は、 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ の何れかであり、それぞれ同じであっても異なっても良い。)

(21) (19)記載の水溶性架橋剤を用いた架橋反応により、水溶性エラスチンを架橋することを特徴とするエラスチン架橋体の製造方法。

(22) 架橋反応時の反応温度が4～150℃の範囲であることを特徴とする(21)記載のエラスチン架橋体の製造方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例8の本発明のエラスチン架橋体の電子顕微鏡写真図である(25℃で反応)。

図2は、実施例9の本発明のエラスチン架橋体の電子顕微鏡写真図である(50℃で反応)。

図3は、実施例10のエラスチン1%ゼラチン架橋成形体を示す図である。

図4は、実施例11のエラスチン10%ゼラチン架橋成形体を示す図である。

図5は、実施例12のエラスチン90%ゼラチン架橋成形体を示す図である。

図6は、実施例13のエラスチン0%/ゼラチン架橋成形体を示す図である。

図 7 は、エラスチン 0 ~ 90 % / ゼラチン架橋成形体比較写真図である。

図 8 は、実施例 14 のヘパリン含有エラスチン架橋成形体を示す図である。

5 図 9 は、実施例 15 のヘパリン含有確認試験を示す図である。

図 10 は、実施例 16 のシート状エラスチン架橋体を示す図である。

図 11 は、実施例 17 のシート状エラスチン架橋体を示す図である。

図 12 は、実施例 17 の糸状エラスチン架橋体を示す図である。

図 13 は、実施例 17 のベレット状エラスチン架橋体を示す図である。

10 図 14 は、細胞接着性タンパク質上での神経細胞芽腫細胞 (IMR-32) の増殖カーブを示す図である。記号はゼラチン ( $\Delta$ ), エラスチン ( $\bullet$ ), アルブミン ( $\square$ )、No はタンパク質をコートした培養プレート上の初期細胞数、Nt は測定時の細胞数を意味する。

15 図 15 は、実施例 19 の線維芽細胞増殖因子含有エラスチン / ヘパリン架橋体を示す図である。

#### 発明の実施の形態

20 本発明に使用する水溶性エラスチンとは特に限定されるものではないが、エラスチンを加水分解して得られるものであり、具体的には、動物の頸靱帯などを熱シュウ酸処理して得られる  $\alpha$ -エラスチン若しくは  $\beta$ -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる  $\gamma$ -エラスチン、エラスターゼにより酵素処理した水溶性エラスチンおよびエラスチン生合成経路における前駆体であるトロポエラスチンなどの少なくとも 1 種以上のエラスチンを使用することができる。トロポエラスチンは特に限定されるものではなく動物細胞からの抽出物でも、遺伝子組換え法により得られるトロポエラスチン遺伝子産物の少なくとも 1 種類以上を使用することができる。

25 弾性タンパク質であるエラスチンは、通常、生体内において、大動脈や声帯など弾性が要求される体内組織に多く存在する。生体内に存在す

るエラスチンは、疎水性アミノ酸の含有量が多いことと、デスモシン、イソデスモシンなどの強固な架橋構造を有することから水不溶性の性質を持つ。該エラスチンは、こうした架橋構造により油状コイルと呼ばれる特有の構造を形成するために弾性を有している。

5 本発明のエラスチン架橋体は、生体内エラスチンの架橋構造を分解し水溶性にした水溶性エラスチンから選ばれた1種以上を水溶性架橋剤で架橋して得ることができる。また本発明のエラスチン成形体は、前述の水溶性エラスチンと水溶性架橋剤を混ぜ合わせ水溶性エラスチン水溶液とした後、成形用のテンプレートなどに流し込み、加熱などで架橋させ  
10 て得ることができる。

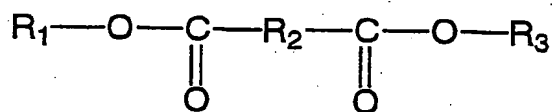
本発明のエラスチン架橋体は、水溶性エラスチンおよび架橋剤以外の第3成分を含有するものであってもよい。該成分は特に限定されるものではない。該成分には、例えばコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンなどのタンパク質やポリグルタミン酸、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリガラクトクチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化  
15 ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒天、キサントガム、カードラン、フルラン、セルロース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、レンチナン等の糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF- $\alpha$  (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子)などの細胞増殖因子、その他ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカプロラクトン、ポリプロ  
20  
25

ビレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、ポリリンゴ酸などの化合物を挙げることができる。さらにはそれらの1種以上を含有しても何ら問題はない。特にコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、  
 5 ヘパリン、コンドロイチン硫酸など細胞外マトリクス成分や bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)などの細胞増殖因子は細胞の接着および増殖を高めるために好ましい。

本発明のエラスチン架橋体に含有する水溶性エラスチンの割合は、エラスチン架橋体に対して0.5～99.5重量%の範囲であることが好ましい。更に好ましくは1～95%であり、この範囲であれば生体に適した弾性を有する成形性良好な成形体を得ることができる。

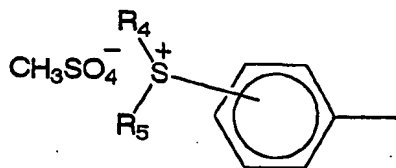
水溶性エラスチンは、全重量の約94%が疎水性アミノ酸、約1%が側鎖にアミノ基を含むアミノ酸(リジン、アルギニン、ヒスチジン)で形成された疎水性タンパク質である。本発明に使用する水溶性架橋剤は、  
 15 水溶性エラスチンの側鎖のアミノ基と反応し、架橋反応するものであれば何れの水溶性架橋剤であっても使用することができる。該水溶性架橋剤としては例えば、グルタルアルデヒド、エチレングリシジルエーテルなどや下記一般式で表される分子中心領域に疎水性部を有し、両末端に活性エステル基を有する化合物などを挙げることができる。中でも下記  
 20 一般式で表される化合物を架橋剤として用いると、生体に適した弾性を有する成形性良好な成形体を得ることができ好ましい。

<一般式>



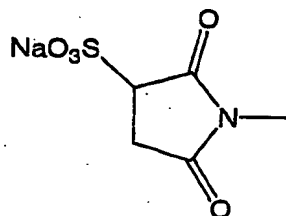
(R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>は下記の構造式で表される<A>または<B>の何れかで  
 25 あり、R<sub>1</sub>とR<sub>3</sub>とは同じであっても異なってもよく、)

<A>



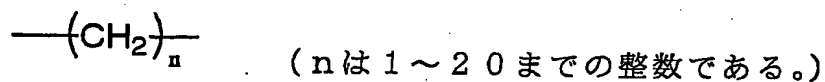
( $R_4$ 、 $R_5$ はH、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかであり、 $R_4$ と $R_5$ とは同じであっても異なってもよい。)

< B >

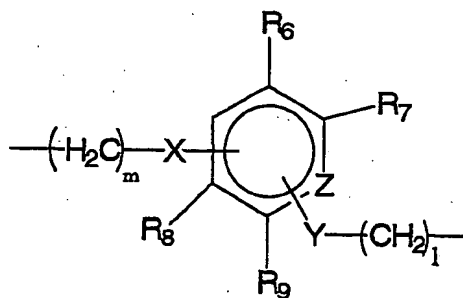


( $R_2$ は下記の構造式で表される< C >または< D >の何れかで表される化合物であり、)

< C >



< D >



( $m$ 、 $l$ は0～15までの整数であり、 $X$ 、 $Y$ は、 $CH_2$ またはOの何れかであり、 $X$ と $Y$ とは同じであっても異なってもよく、 $Z$ はCまたはNの何れかであり、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ は、H、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ の何れかであり、それぞれ同じであっても異なってもよい。)

分子中心領域に疎水性部を有する化合物は、疎水性アミノ酸を多く含

むエラスチンと、疎水相互作用により強固で安定した構造体を形成する。しかし、疎水性部を多く含む化合物は、有機溶媒には可溶ではあるが、水に難溶または不溶となり水系で取り扱いにくい。本発明の水溶性架橋剤は上記一般式で表されるジカルボン酸化合物の両末端を 4-hydroxyphenyldimethyl-sulfoniummethylsulfate (4ヒドロキシフェニルジメチルースルホニウムメチルサルフェイト：以下 DSP) で活性エステル化させたもので、疎水性アミノ酸を多く含むエラスチンと強固な安定した構造体を取る疎水性部を有しながら、かつ水に溶解し水系で取り扱える特徴を有するものである。

また本発明の水溶性架橋剤は、その化学式の両末端の活性エステル基が、水溶性エラスチンのアミノ酸とペプチド結合し、架橋する。従って、本発明の水溶性架橋剤により架橋して得られたエラスチン架橋体は、生体内で生分解を受け易い特徴を有する。その生分解速度は、エラスチン架橋体の架橋度と関係するため、架橋条件を変え架橋度を変えることにより制御することができる。

本発明のエラスチン架橋体の構造は、特に限定するものではないが、体液や培養液などが浸透できるように空隙を有するスポンジ構造であることが好ましい。該空隙の大きさは特に限定されるものではないが、その平均直径が  $20\text{ }\mu\text{m}$  未満の場合、ヤング率（弾性率）が高く硬い架橋体を得やすい。また、 $20\text{ }\mu\text{m} \sim 2\text{ mm}$  の範囲の場合、ヤング率（弾性率）が低く膨潤度の高い成形可能な架橋体を得やすい。

本発明のエラスチン架橋体は、弾性に優れる架橋体であるが、生体に適合し易くするためにヤング率（弾性率） $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7\text{ Pa}$  の範囲が好ましく、特に $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6\text{ Pa}$  の範囲が好ましい。

本発明のエラスチン成形体の形状は特に限定されるものではないが、医療用途への適用では、糸状、膜状、棒状、ベレット状またはチューブ状などであることが好ましい。

さらに、本発明のエラスチン架橋体は、そのみで特定の構造体を形

成してもよく、あるいはエラスチン架橋体以外の成分と複合体を形成させても良い。また、エラスチン架橋体以外の構造体の表面コーティングに用いても良い。複合体を形成させる成分としては、特に限定されるものではないが、例えばコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィ  
5 ブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロニンなどのタンパク質やポリグルタミン酸、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリガラクトチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、  
10 アラビアガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒天、キサントガム、カードラン、プルラン、セルロース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、レンチナン等の糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、  
15 TGF- $\alpha$  (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子) などの細胞増殖因子、その他ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカプロラクトン、ポリプロピレンエーテル、  
20 ポリテトラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、ポリリンゴ酸などの化合物を挙げることができる。さらにはこれらを1種以上を用いてもよい。これによりエラスチンにない細胞接着性や抗血栓性等の生体機能を付与でき、また目的とする組織の増殖速度を速めることもできる。

25 水溶性エラスチンと水溶性架橋剤との架橋反応の条件は特に限定されるものではないが、反応温度は常圧またはオートクレーブなどの加圧下で4~150℃の範囲であることが好ましい。特に架橋の操作性の点から10~120℃の範囲が好ましい。また本発明のエラスチン架橋体が

空隙を有するスポンジ状である場合には、反応温度を制御することにより、空隙の直径を制御することができる。例えば、反応温度が4～50℃の範囲では、空隙の平均直径が20μm以上の架橋体を得ることができ、50～150℃の範囲では空隙の平均直径が20μm未満の架橋体を得ることができる。

本発明のエラスチン架橋体の成形方法は特に限定されるものではないが、一般的な合成樹脂の成形に用いられる成形用の型を用いて得ることができる。例えば水溶性エラスチンと本発明の水溶性架橋剤を混ぜ合わせ、水溶性エラスチン水溶液とした後、成形器に流し込み、オートクレーブなどで加熱し架橋させると、その鋳型を反映した糸状、膜状、棒状、ベレット状またはチューブ状などのエラスチン架橋体を得ることができる。

本発明のエラスチン架橋体は、生体と同じ領域の弾性を有するため伸縮性に優れ、化粧品、医療用具として有効に用いることができる。特に限定されるわけではないが、例えば化粧品としては、スキンケア商品としてのフェイスマスク用基材として利用できる。医療用具としても特に限定されるわけではないがカテーテル、シャンテ、創傷被覆剤等の部品に成形し適用したものは、従来にない柔軟な機能を提供することとなる。

またこれらを再生医療用材料として本発明の医療器具を体内に埋め込んだ場合には、目的とする組織が体内で順調に増殖し易くなる。特に前述した神経細胞や血管に対して有効である。

さらに細胞増殖速度を速め、生体適合性を改善するために、エラスチン架橋体と第3成分を含有させて本来のエラスチンにはない機能を付与することもできる。例えば、抗血栓性があり細胞増殖因子と相互作用するヘパリンや細胞増殖因子を含有させることができる。

これらの第3成分は、エラスチン架橋体を作製するときに、予め原料として加えておき架橋体を形成させてもよく、またエラスチン架橋体を形成させた後、その構造体に含浸させたり、その後乾燥させて物理的に



吸着させたりしても良い。また更には、第3成分の脱理を抑えるために該エラスチン架橋体に化学的に固定化しても良い。

本発明のエラスチン架橋体はDDS（ドラッグ・デリバリー・システム）の一つである徐放担体としても使用できる。特に本発明のエラスチン架橋体は高いヤング率（弾性率）と空隙を有するスポンジ構造体を得ることができ、神経、血管などの治療に効果を発揮することができる。

本発明の医療用具は、前述のような機能、効果を有することから、外科治療法に用いた場合には特に有効である。例えば現在シートの片面にフィブリン、トロンビン等の血液凝固成分を固着させたコラーゲンシートが、手術後の止血用接着剤として用いられている。これは、手術によって生じた内臓の出血個所をシートで多い、血液凝固成分による止血とコラーゲン膜による物理的圧迫による止血の相乗効果と、取扱い易さを狙ったものであるが、コラーゲンシートは伸縮性が乏しく、心臓のような激しく動く臓器に適用した場合、圧着性が良くなかった。これに本発明のエラスチン架橋膜を使用することで、伸縮性が高く臓器の動きに対応できる膜を得ることができる。また更には、本発明のエラスチン架橋膜とコラーゲンの複合体を形成させれば、エラスチンの持つ伸縮性とコラーゲンの持つ細胞接着性の両者の特徴を有する、極めて生体適合性の高い膜が得られる。

本発明のエラスチン架橋体は、前述の様に体内に埋め込み、血管や神経の再生の場としても利用できるが、この機能を体外でも利用することができる。すなわち、再生医療用培養基材として、本発明の膜表面、チューブ内に、方向付けされた胚性幹（ES）細胞、体性幹細胞、間葉系幹細胞などを移植、培養することで、希望する形態の臓器を形成させることが可能となる。本発明のエラスチン架橋体は、成形性が良いだけでなく生分解性でもあるため、ある程度培養し、形を形成させた臓器を培養基材ごと移植するカートリッジ型の再生医療方法と再生組織を提供できる。

## 実施例

以下実施例をもって本発明を詳細に説明する。本実施例においては特に断りがない限り「%」は「重量%」を意味する。

## 実験例 1 (水溶性エラスチンの調製)

- 5 粉末状水不溶性エラスチン (エラスチン・プロダクト (Elastin product) 社製) 20g に対し 0.25M シュウ酸 150ml を加え、100 °C にて 1 時間処理する。冷却後、遠心分離 (3000rpm, 30min) し、上澄みを集めセルロース性透析チューブ (分画分子量 6 千~1 万) に入れ、脱イオン水に対して 48 時間透析しシュウ酸を除去する。その後凍結乾燥して水溶性エラスチンを得た。原料エラスチンと水溶性エラスチンのアミノ酸分析結果を表 1 に示した。

【表 1】

	エラスチン (mol%)	水溶性エラスチン (mol%)
15 アスパラギン酸	0.612	0.542
トレオニン	0.778	0.983
セリン	0.665	0.964
グルタミン酸	1.668	1.923
グリシン	33.22	30.869
アラニン	22.78	25.512
システイン	0.376	0.562
20 バリン	13.374	12.652
イソロイシン	2.568	2.249
ロイシン	6.235	6.001
チロシン	0.703	0.976
フェニルアラニン	2.967	3.023
リシン	0.279	0.381
ヒスチジン	0.037	0.063
25 アルギニン	0.516	0.68
ヒドロキシプロリン	1.168	1.007
プロリン	11.699	11.612
合計	100.00	100.00

実験例 2 (架橋剤としてグルタルアルデヒドを使用しエラスチン架橋体を作製)

5 脱イオン水 161 $\mu$ l に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 90mg を加え溶解させ、水溶性エラスチン水溶液を得た。該水溶液に 250mM グルタルアルデヒド水溶液 (東京化成社製) 48.7 $\mu$ l を加え、直後にゲル状のエラスチン架橋体を得た。該ゲル状のエラスチン架橋体は成形用の直径 2mm、長さ 2cm 円柱状のテンプレートに流し込もうとしたが、流動性が小さく流し込むことはできなかった。250mM グルタルアルデヒド水溶液の添加量を前述の 1/10 の量に下げても、テンプレートに流し込むことが困難であった。

実験例 3 (架橋剤としてエチレングリコールジグリシジルエーテルを使用しエラスチン架橋体を作製)

15 脱イオン水 41.6 $\mu$ l に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 36mg を加え溶解させ、水溶性エラスチン水溶液を得た。該水溶液に 287mM エチレングリコールジグリシジルエーテル水溶液 42.4 $\mu$ l を加えよくかき混ぜ、その溶液を直径 2mm、長さ 2cm 円柱状のテンプレートに流し込み、50°C、1 時間加熱してゲル状のエラスチン架橋体を得た。得られたゲル状のエラスチン架橋体を脱イオン水で充分洗浄し両端を指で引っ張り簡易伸張試験を行った結果、伸長の変形に対して壊れやすかった。

20 実験例 4 (架橋剤として水溶性カルボジイミドを使用しエラスチン架橋体を作製)

25 脱イオン水 10.4 $\mu$ l に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 50mg を加え溶解させ、水溶性エラスチン水溶液を得た。該水溶液に 274mM 水溶性カルボジイミド (WSCD、ペプチド研究所社製) 水溶液 10.4 $\mu$ l を加え、更に 645 mM アジピン酸水溶液 24.4 $\mu$ l を加えよくかき混ぜ、30%エラスチン水溶液を作成した。結果、長鎖ジカルボン酸は脱イオン水には溶解せず (アルカリ性の場合には溶解するが、その場合はカルボジイミドとの反応性が速く、やはり溶解不完全のまま一部固化し、各種テンプレート (型: ガ

ラス管、膜作成用型など)に流し込むのは不可能であった。

実験例 5 (架橋剤として光反応性スクシンイミドエステルを使用しエラスチン架橋体を作製)

5 脱イオン水 1ml に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 13mg および光反応性スクシンイミドエステル (NHS-ASA、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドアルチル酸 (N-hydroxysuccinimidyl-4-Azidosalicylic Acid), ピアス社製 (PIERCE)) 4mg を加え溶解させ、室温で 1 日反応させた。反応終了後、未反応物を除去し精製し、光反応性エラスチン 7mg  
10 を得た。これに脱イオン水 20  $\mu$ l を加えて光反応性エラスチン水溶液とし、365 nm の紫外線 (UV) 照射を 90 分間行いゲル状化させた。ゲル化後は脱イオン水で充分洗浄した。結果、架橋剤は水不溶性であるため反応性は低く、有機溶媒中ではエラスチンが不溶化するためやはり反応性が悪かった。光照射に関しても、エラスチン水溶液の濃度が薄い (数%) 場合は UV 光が透過するが、10%以上の濃度では、光の照射面のみの反応で集結  
15 するためゲル化率が悪く、テンプレート内での反応はほぼ不可能であった。

実験例 6 (架橋剤としてアジピン酸スクシンイミドエステルを使用しエラスチン架橋体を作製)

20 脱イオン水 119  $\mu$ l に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 60 mg を加え溶解させた後、385 mM アジピン酸スクシンイミドエステル水溶液を 21  $\mu$ l 加え、該水溶液を直径 2mm、長さ 2cm 円柱状のテンプレートに流し込み、80°C で 1 時間加熱しゲル化させた。結果、架橋剤が一部不溶化しているためか、生成したゲルは弱い (テンプレートの形はなしていない)。  
ドデカンジカルボン酸スクシンイミドエステルは水に不溶のため反応しなかった。

25 実験例 7 (水溶性架橋剤 [A] の作製)

ジカルボン酸のカルボキシル基を 4-hydroxyphenyldimethylsulfoniummethylsulfate (4-ヒドロキシフェニルジメチルスルホニウムメチルサルフェイト: 以下 DSP) により活性エステル化させた。DSP

による活性エステル化には、ペプチド化学等で報告されている方法 (K. Kouge, T. Koizumi, H. Okai, and T. Kato. (1987) Bull. Chem. Soc. Jpn., 60, 2409. (日本化学会報誌) を用いて、以下の実験を行った。

ドデカンジカルボン酸 (2.5 mmol) と DSP (5 mmol) をアセトニトリル (35ml) に 60°C で溶解し、放冷後 dicyclohexylcarbodiimide (ジシクロヘキシルカルボジイミド: 以下 DCC) (5mmol) を加え 25°C で 5 時間攪拌した。その後反応中に生じたジシクロヘキシル尿素 (以下 DC-Urea) をガラスフィルターでろ過し除去した。更に、反応溶液 (ろ液) をエーテル (70ml) に滴下して固化させた。該固形物を減圧乾燥して、本発明の水溶性架橋剤 [A] 1.4 g を得た。得られた架橋剤の純度は <sup>1</sup>H-NMR (JNM-EX-500, JEOL) による測定で 98% であった。

実験例 8 (架橋剤として実験例 7 で得た水溶性架橋剤 [A] を使用しエラスチン成形体を作製)

脱イオン水 1 ml に、実験例 1 で得た水溶性エラスチン 200 mg を加えてよく攪拌し、2.0% 水溶性エラスチン水溶液を得た。該水溶液の温度を 25°C とし、これに実験例 7 で得た水溶性架橋剤 [A] 72 μmol (該水溶液中のエラスチンのアミノ基量 (24 μmol) の 3 倍量) を加え 5 分間攪拌した。次にトリエチルアミンを 24 μmol 加え更に 5 分間攪拌した後、直径 2mm、長さ 2cm 円柱状のテンプレートに流し込み 2 日間静置しゲル化させ、脱イオン水で充分洗浄し乳白色で弾性に富む棒状のエラスチン成形体を得た。また、得られたエラスチン成形体を 110°C で 10 分間オートクレーブ処理を行い、形状に変化が見られない滅菌されたエラスチン成形体を得た。得られたエラスチン成形体のヤング率を引っ張り強度試験機を用いて測定した結果を表 2 に示す。但し測定は得られたエラスチン成形体をそのまま使用し水中にて行った。また、得られたエラスチン成形体の切断面を 90 倍の倍率で走査型顕微鏡撮影した物を図 1 に示す。電子顕微鏡写真から、エラスチン架橋体の内部構造は、空隙を有するスポンジ構造であり、その平均直径は 62 μm であった。空隙

の異なるエラスチン架橋体の弾性率を表 2 に示した。

【表 2】

ゲル作成温度	弾性率 (25℃)	弾性率 (50℃)
20℃	1.2-3.5 $10^3$ Pa	1.0-4.0 $10^3$ Pa
50℃	1.5-7.8 $10^3$ Pa	0.7-5.0 $10^3$ Pa

実験例 9 (架橋剤として実験例 7 で得た水溶性架橋剤 [A] を使用し架橋条件を変えエラスチン成形体を作製)

該水溶液の温度を 50℃ とし静置時間を 6 時間とした以外は、実験例 8 の製造に準じて架橋反応並びに成形を行い、乳白色で弾性に富む棒状のエラスチン成形体を得た。得られたエラスチン成形体のヤング率を引っ張り強度試験機を用いて測定した結果を表 2 に示す。但し測定は得られたエラスチン成形体をそのまま使用し水中にて行った。また、得られたエラスチン成形体の切断面を 90 倍の倍率で走査型顕微鏡撮影した物を図 2 に示す。電子顕微鏡写真から、エラスチン架橋体の内部構造は、空隙を有するスポンジ構造であり、その平均直径は 9  $\mu$ m であった。

実験例 10 (エラスチン含有量を全体の 1% としたエラスチン架橋体およびその成形体を作製)

実験例 1 で得た水溶性エラスチン 0.8mg およびゼラチン 72mg に脱イオン水 148  $\mu$ l を加えて溶解させた後、実験例 7 で作製した水溶性架橋剤 278mM、39  $\mu$ l (架橋剤はエラスチンのアミノ基量の 2 倍に相当) 加え、30% 水溶性エラスチン水溶液を作製した。該水溶液を成形型に流し込み、120℃、30 分間オートクレーブで加熱しエラスチン架橋体およびその成形体 (図 3) を得た。

実験例 11 (エラスチン含有量を全体の 10% としたエラスチン架橋体およびその成形体を作製)

実験例 1 で得た水溶性エラスチン 8mg およびゼラチン 72mg に脱イオン水 148  $\mu$ l を加えて溶解させた後、実験例 7 で作製した水溶性架橋剤

278mM、39 $\mu$ l（架橋剤はエラスチンのアミノ基量の2倍に相当）加え、30%水溶性エラスチン水溶液を作製した。該水溶液を成形型に流し込み、120°C、30分間オートクレーブで加熱しエラスチン架橋体およびその成形体（図4）を得た。

- 5 実験例12（エラスチン含有量を全体の90%としたエラスチン架橋体およびその成形体を作製）

実験例1で得た水溶性エラスチン72mgおよびゼラチン8mgに脱イオン水148 $\mu$ lを加えて溶解させた後、実験例7で作製した水溶性架橋剤278mM、39 $\mu$ l（架橋剤はエラスチンのアミノ基量の2倍に相当）加え、  
10 30%水溶性エラスチン水溶液を作製した。該水溶液を成形型に流し込み、120°C、30分間オートクレーブで加熱しエラスチン架橋体およびその成形体（図5）を得た。

実験例13（エラスチン含有量を全体の0%としたゼラチン架橋体およびその成形体を作製）

- 15 ゼラチン80mgに脱イオン水148 $\mu$ lを加えて溶解させた後、実験例7で作製した水溶性架橋剤278mM、39 $\mu$ l（架橋剤はエラスチンのアミノ基量の2倍に相当）加え、30%水溶性エラスチン水溶液を作製した。該水溶液を成形型に流し込み、120°C、30分間オートクレーブで加熱しエラスチン架橋体およびその成形体およびその成形体（図6）を得た。

- 20 実験例10～13の結果をまとめると、エラスチン含有が0%の場合は膨潤が大きい（水中で、6時間後、テンプレートの直径の2.3倍程度にまで膨潤した）、1%含有のゲルからは形状がしっかりしたゲルが形成された（図7：エラスチン含有0,1,10,90%）。他のゲルの膨潤性は1%ゲルでテンプレートの1.5倍程度、10%ゲルでテンプレートの1.4倍程度、  
25 90%ゲルでテンプレートの1.1倍程度であった。

エラスチンの含有率が高くなるにつれ、その形状安定性は高い。伸長させた場合は、弾性率は不明だが含有率の低いゲルの方がちぎれやすく、強度が低い。

ゲルの色は水溶性エラスチン溶液が黄色なため含有率が高くなるにつれ、その影響が出て黄色味を帯びた。

実験例 1 4 (架橋原料がさらに糖質を含有したエラスチン架橋体およびそのエラスチン成形体を作製)

- 5 実験例 1 で得た水溶性エラスチン 75mg およびヘパリン 5mg に脱イオン水 148 $\mu$ l を加えて溶解させた後、実験例 7 で作製した水溶性架橋剤 278mM、39 $\mu$ l (架橋剤はエラスチンのアミノ基量の 2 倍に相当) 加え、30% 水溶性エラスチン水溶液を作製した。該水溶液を成形型に流し込み、120°C、30 分間オートクレーブで加熱しエラスチン架橋体およびその成形体 (図 8) を得た。

実験例 1 5 (ヘパリン含有の確認)

- 15 作成したゲルを脱イオン水で充分洗浄した後、1% トルイジンブルー"0"水溶液中で染色した。トルイジンブルー"0"はヘパリンに結合すると青→紫に染色される。図 9 よりヘパリンがゲルに取り込まれていることが確認できた。

実験例 1 6 (エラスチン膜の作製)

- 20 リベルシラン処理 (シリコンコート) したスライドガラスを 2 枚用い、スペーサーとしてシリコンゴムシートを用いた成形用の型を用意し、実験例 1 で得た 30% 水溶性エラスチン水溶液と実験例 7 で作製した水溶性架橋剤 (エラスチンのアミノ基に対して 3 倍モル) を混合した溶液を流し込み、外部より空気・水が入らないようにした。この状態を保ちながら水中で 80°C、30 分間加熱処理し、エラスチン膜 (図 10) を得た。

実験例 1 7 (エラスチン各種成形体の調製)

- 25 各種成形用の型を用意し、30% 水溶性エラスチン水溶液と実験例 7 で作製した水溶性架橋剤 (エラスチンのアミノ基に対して 3 倍モル) を混合した溶液を流し込み、外部より空気・水が入らないようにした。この状態を保ちながら水中で 80°C、30 分間加熱処理し、チューブ状 (図 11)、糸状 (図 12)、ペレット状 (図 13) の成形物を得た。



## 実験例 18 (細胞培養方法と増殖速度)

組織培養用プラスチックシャーレ (6 穴) にエラスチン膜 (厚さ 0.5mm, 1cm×1cm) をおき、培養液を 2ml 加え 37°C で 30 分間静置した。培養液は MEM ハンクス 粉末 2.57g に脱イオン水 215ml を加え溶解した後、重曹溶液 (7.5%) を 1.17ml、グルタミン溶液 (200mM) を 2.5ml、非必須アミノ酸溶液を 2.5ml 添加、ゲンタマイシン 5ml そして牛胎児血清を 25ml 添加して作製した。

これに神経細胞芽腫細胞 (ニューロブラストーマ、IMR-32 (ATCC No. CCL-127)) を  $1.0 \times 10^4$  cell/ml 濃度で 100  $\mu$ l 播種して 24 時間 37°C でインキュベーションした後、経時的に細胞数を細胞計測板あるいは直接観察にて計測した。

対象として、アルブミンコートを用いた場合の、細胞増殖性を評価した。また培地は毎日交換した。実験回数は 3 回行った。

(結果) エラスチン (シート) の細胞播種から 3 日後の細胞増殖率は約 4 倍程度。アルブミンコートの場合は細胞播種から 3 日後の細胞増殖率は約 1.5 倍程度であった。増殖曲線を図 14 に示した。

## 実験例 19 (繊維芽細胞増殖因子 (FGF) とヘパリンを含有したエラスチンゲル)

水溶性エラスチン 75 mg およびヘパリン 5 mg に脱イオン水 148.1  $\mu$ l を加え溶解させた後、実験例 7 で作製した水溶性架橋剤 (278 mM) 39  $\mu$ l を加え、30% エラスチン水溶液を作成する。溶液を成形型に流し込み、120°C (オートクレーブ) で 30 分加熱して反応させた。作成したゲルを 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5) で洗浄した後、2  $\mu$ g/ml 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5) に 24 時間浸し、ゲルに含有したヘパリンに吸着させた。得られた成形物を図 15 に示した。

## 産業上の利用可能性

本発明のエラスチン架橋体は、細胞接着性タンパク質の脱理が起こらず、生体移植に適合し得る弾性を有した材料であるため、従来の材料に

生じていた長期の治療の間に該細胞接着性タンパク質が脱離する問題や、神経や血管などの組織の再生が不十分である問題などを解決する効果を有する。

5      また、本発明の水溶性架橋剤は、水溶性エラスチンを架橋し、鋳型があればどんな成形も可能な弾性を有するエラスチン架橋体を得られるため、その成形体を糸状や膜状、棒状、ペレット状、チューブ状、更には再生医療用材料や医療用器具材料などに加工し、幅広い用途での利用を可能とする効果を有する。

10      更に、本発明のエラスチン架橋体は、空隙を有するスポンジ構造を形成することから、薬剤などの浸透や、他の材料との複合を容易に行うことができ、新しい医療用材料の提供を可能とする効果を有する。

## 請求の範囲

1. 水溶性エラスチンから選ばれた1種以上を含有する架橋原料が、水溶性架橋剤で架橋されてなるエラスチン架橋体。
2. 架橋原料がさらに、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンであるタンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリアミノ酸、ポリガラクトチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒天、キサンタンガム、カードラン、ブルラン、セルロース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、レンチナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF- $\alpha$  (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子)である細胞増殖因子、ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカプロラクトン、ポリプロピレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、およびポリリンゴ酸から選ばれた1種以上を含有する請求項1記載のエラスチン架橋体。
3. 水溶性エラスチンの含有率が0.5~99.5重量%の範囲である請求項1記載のエラスチン架橋体。
4. ヤング率が $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$  Paの範囲のである請求項1記載のエラスチン架橋体。
5. 内部構造が空隙を有するスポンジ構造である請求項1記載のエラスチン架橋体。

6. 空隙の平均直径が  $20\text{ }\mu\text{m}$  未満の範囲である請求項 5 記載のエラスチン架橋体。

7. 空隙の平均直径が  $20\text{ }\mu\text{m}\sim 2\text{ mm}$  の範囲である請求項 5 記載のエラスチン架橋体。

- 5 8. コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンであるタンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリアミノ酸、ポリガラクチュロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、デキ
- 10 ストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビアガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、カラギーナン、寒天、キサントガム、カードラン、プルラン、セルロース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、レンチ
- 15 ナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF- $\alpha$  (形質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、CTNF (毛様体神経栄養因子) である細胞増殖因子、ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエ
- 20 チレン、ポリカプロラクトン、ポリプロピレンエーテル、ポリテトラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビニールアルコール、およびポリリンゴ酸から選ばれた 1 種以上が化学的に結合された請求項 1 または 2 記載のエラスチン架橋体。

- 25 9. 化学的結合が架橋剤を用いた架橋である請求項 8 記載のエラスチン架橋体。

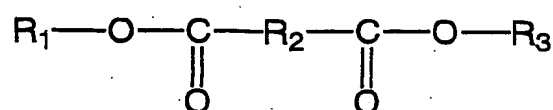
10. コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、カゼイン、ケラチン、セリシン、トロンビンであるタンパク質、ポリグルタミン酸、ポリリジンであるポリアミノ酸、ポリガラクチュロン

酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸、  
 コンドロイチン、デキストラン硫酸、硫酸化セルロース、アルギン酸、  
 デキストラン、カルボキシメチルキチン、ガラクトマンナン、アラビア  
 5 ガム、トラガントガム、ジェランガム、硫酸化ジェラン、カラヤガム、  
 カラギーナン、寒天、キサントガム、カードラン、プルラン、セルロ  
 ース、デンプン、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、大  
 豆水溶性多糖、グルコマンナン、キチン、キトサン、キシログルカン、  
 レンチナンである糖質、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)、TGF- $\alpha$  (形  
 質転換増殖因子 $\alpha$ )、EGF (上皮増殖因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、  
 10 CTNF (毛様体神経栄養因子) である細胞増殖因子、ポリメタクリル酸メ  
 チル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコ  
 ーン、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、  
 ポリエチレン、ポリカプロラクトン、ポリプロピレンエーテル、ポリテ  
 トラメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、ポリビ  
 15 ニールアルコール、およびポリリンゴ酸から選ばれた1種以上を含有す  
 る請求項1、2または8記載のエラスチン架橋体。

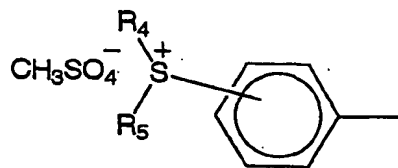
1 1. 水溶性架橋剤が分子中心領域に疎水性部を有し、両末端にアミノ  
 基と反応する活性エステル基を有する水溶性化合物である請求項1記載  
 のエラスチン架橋体。

20 1 2. 水溶性架橋剤が、下記一般式で表される水溶性化合物であることを  
 を特徴とする請求項1記載のエラスチン架橋体。

<一般式>

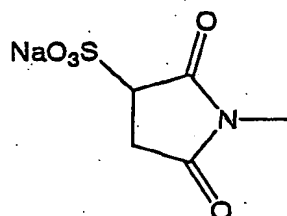


25 [R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>は下記の構造式で表される<A>または<B>の何れかで  
 あり、R<sub>1</sub>とR<sub>3</sub>とは同じであっても異なってもよく、  
 <A>



( $R_4$ 、 $R_5$ はH、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかであり、 $R_4$ と $R_5$ とは同じであっても異なってもよい。)

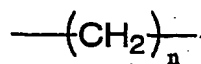
<B>



5

( $R_2$ は下記の構造式で表される<C>または<D>の何れかで表される化合物であり、)

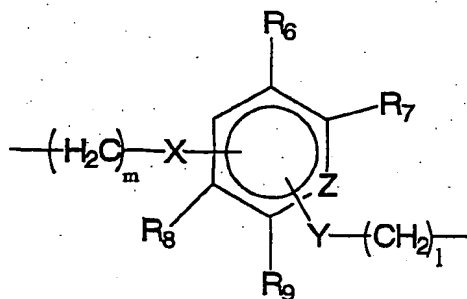
<C>



10

( $n$ は1～20までの整数である。)

<D>



( $m$ 、 $l$ は0～15までの整数であり、 $X$ 、 $Y$ は、 $CH_2$ またはOの何れかであり、 $X$ と $Y$ とは同じであっても異なってもよく、 $Z$ はCまたはNの何れかであり、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ は、H、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ の何れかであり、それぞれ同じであっても異なってもよい。)

15

13. 請求項1～12の何れか1項記載のエラスチン架橋体からなるエラスチン成形体。

14. 形状が、糸状、膜状、棒状、ペレット状またはチューブ状である請求項13記載のエラスチン成形体。

5 15. 請求項1記載のエラスチン架橋体を用いた医療用器具。

16. 請求項15記載の医療用器具を用いることを特徴とする外科治療方法。

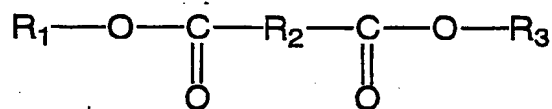
17. 請求項1記載のエラスチン架橋体、請求項15記載の医療用器具を用いることを特徴とする再生医療。

10 18. 請求項1記載のエラスチン架橋体を用いて得られた再生組織。

19. 分子中心領域に疎水性部を有し、両末端にアミノ基と反応する活性エステル基を有する水溶性化合物を含有する架橋剤。

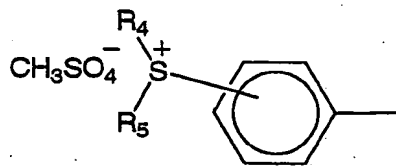
20. 化合物が、下記一般式で表される化合物である請求項19記載の架橋剤。

15 <一般式>



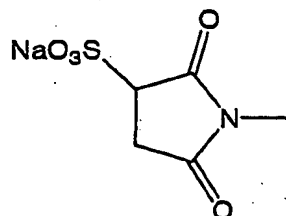
( $R_1$ 、 $R_3$ は下記の構造式で表される<A>または<B>の何れかであり、 $R_1$ と $R_3$ とは同じであっても異なってもよく、)

<A>



20 ( $R_4$ 、 $R_5$ はH、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかであり、 $R_4$ と $R_5$ とは同じであっても異なってもよい。)

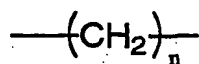
<B>



( $R_2$  は下記の構造式で表される<C>または<D>の何れかで表される化合物であり、)

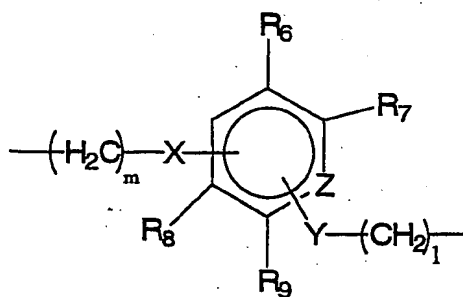
<C>

5



( $n$  は 1 ~ 20 までの整数である。)

<D>



10

( $m$ 、 $l$  は 0 ~ 15 までの整数であり、 $X$ 、 $Y$  は、 $CH_2$  または  $O$  の何れかであり、 $X$  と  $Y$  とは同じであっても異なってもよく、 $Z$  は  $C$  または  $N$  の何れかであり、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$  は、 $H$ 、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$  の何れかであり、それぞれ同じであっても異なっても良い。)

21. 請求項 19 記載の水溶性架橋剤を用いた架橋反応により、水溶性エラスチンを架橋することを特徴とするエラスチン架橋体の製造方法。

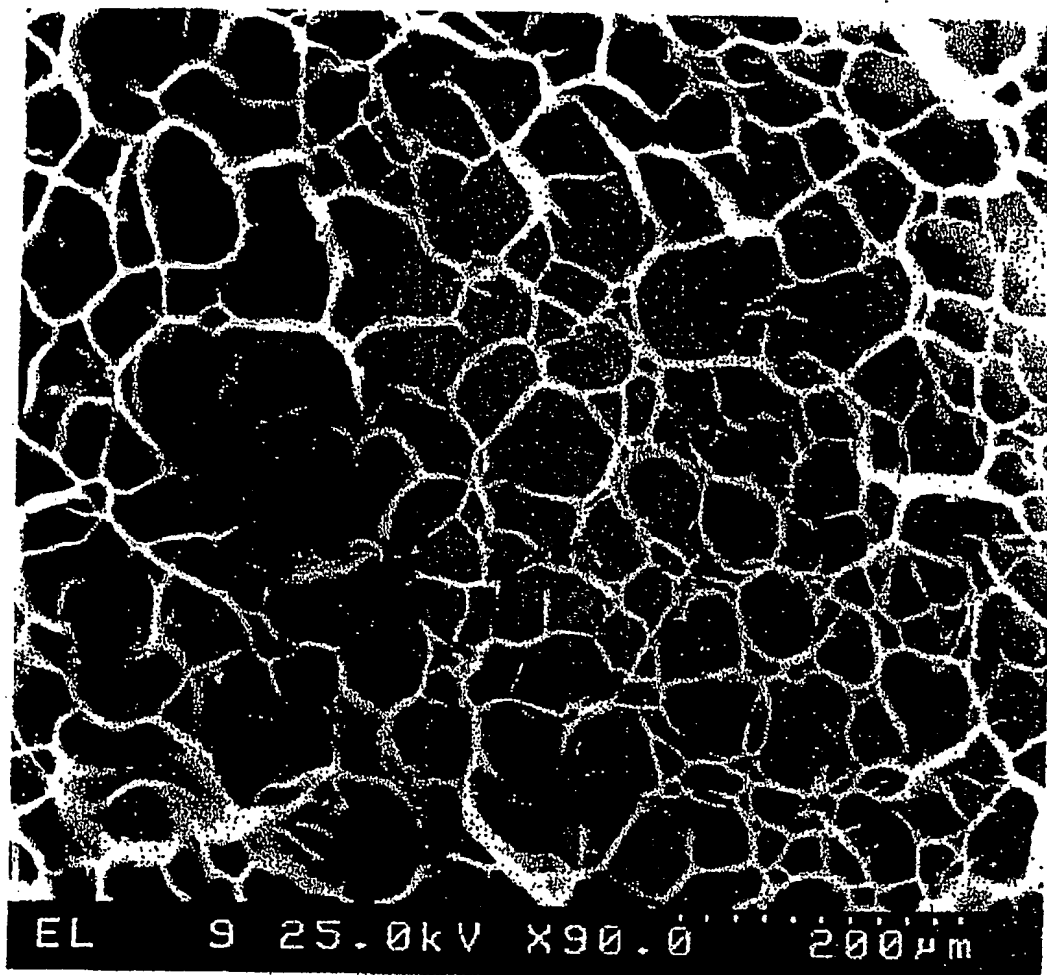
15

22. 架橋反応時の反応温度が 4 ~ 150 °C の範囲であることを特徴とする請求項 21 記載のエラスチン架橋体の製造方法。



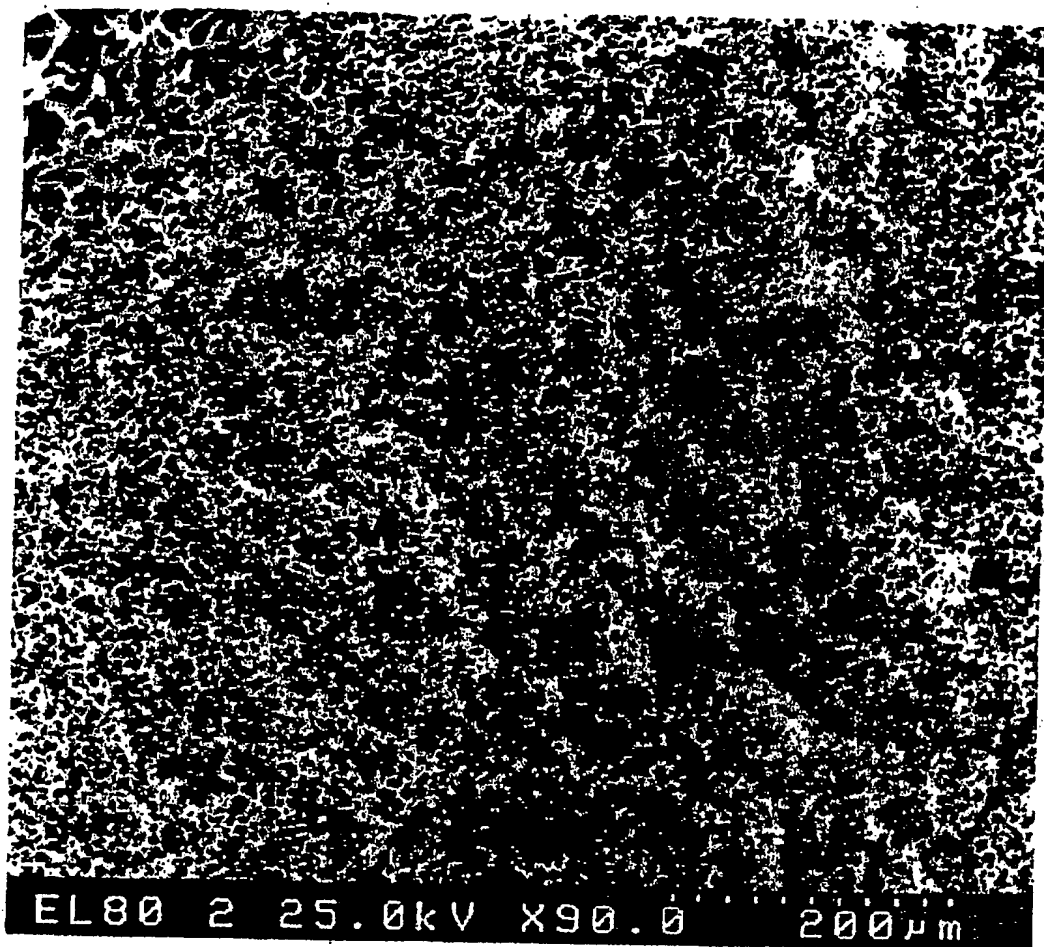
☒ 1

1/15



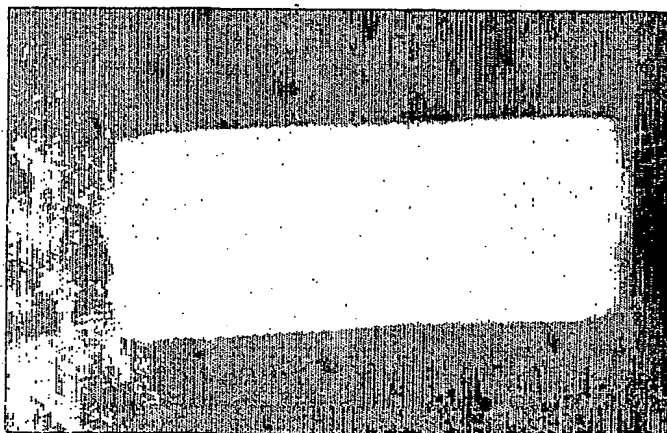
☒ 2

2/15



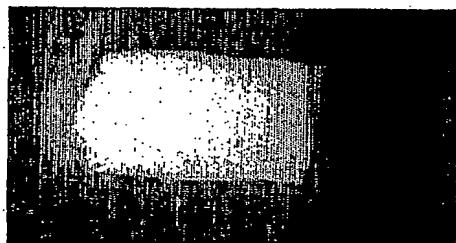
3/15

図 3



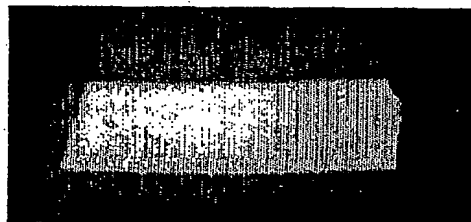
4/15

図 4



5/15

図 5



6/15

図 6

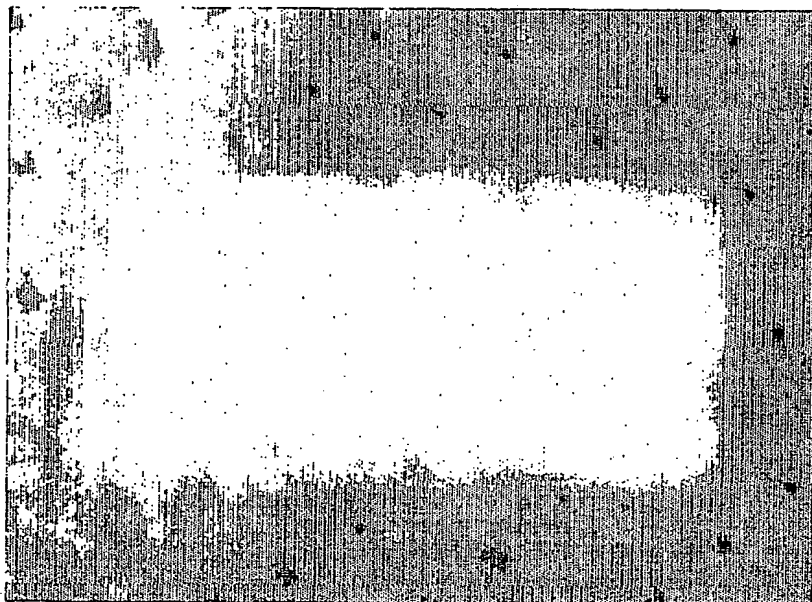
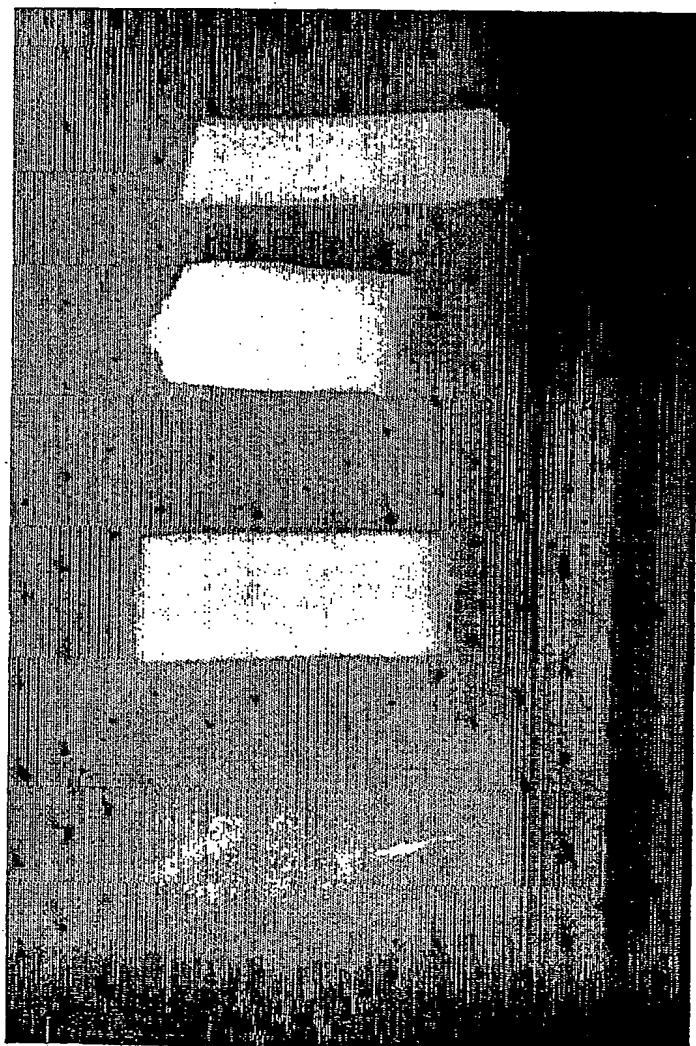


図 7

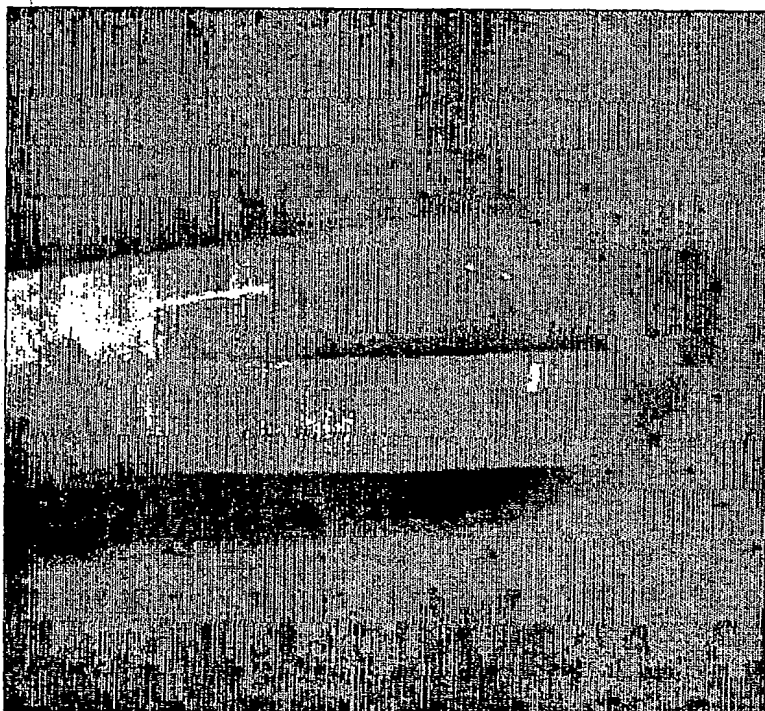
7/15



Elastin:Gelatin	Elastin:Gelatin	Elastin:Gelatin	Elastin:Gelatin
= 0:100	= 1:99	= 10:90	= 90:10

8/15

図 8





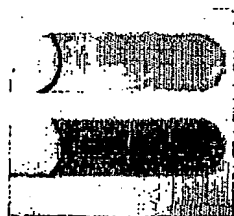
9/15

図 9

トリイジンブルー0による染色



トリイジンブルー0による発色



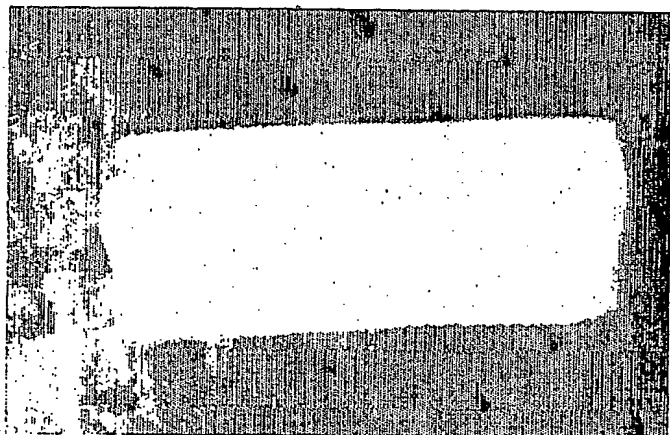
Heparin  
非含有水溶液 含有水溶液



Heparin  
Heparin非含有  
ブレンド (5%)

10/15

図 10

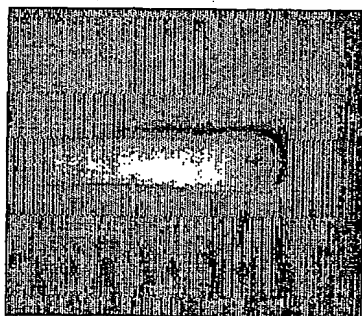


WO 02/096978

PCT/JP02/05275

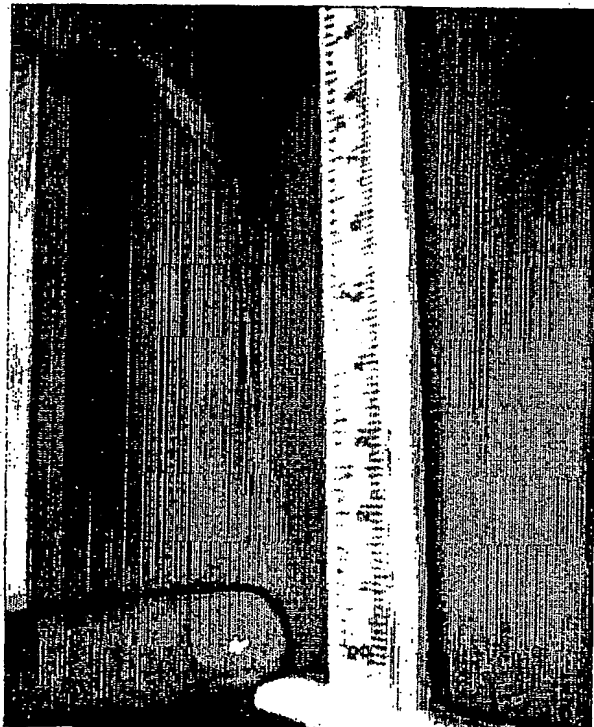
11/15

☒ 1 1

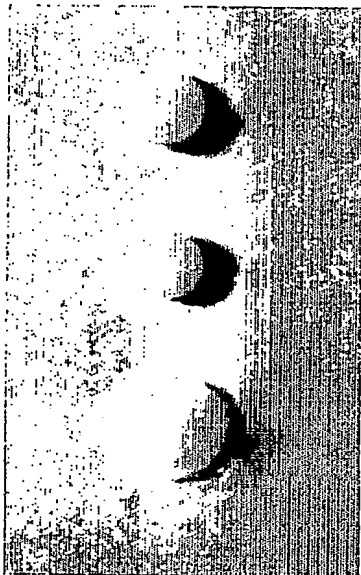


12/15

図 1 2

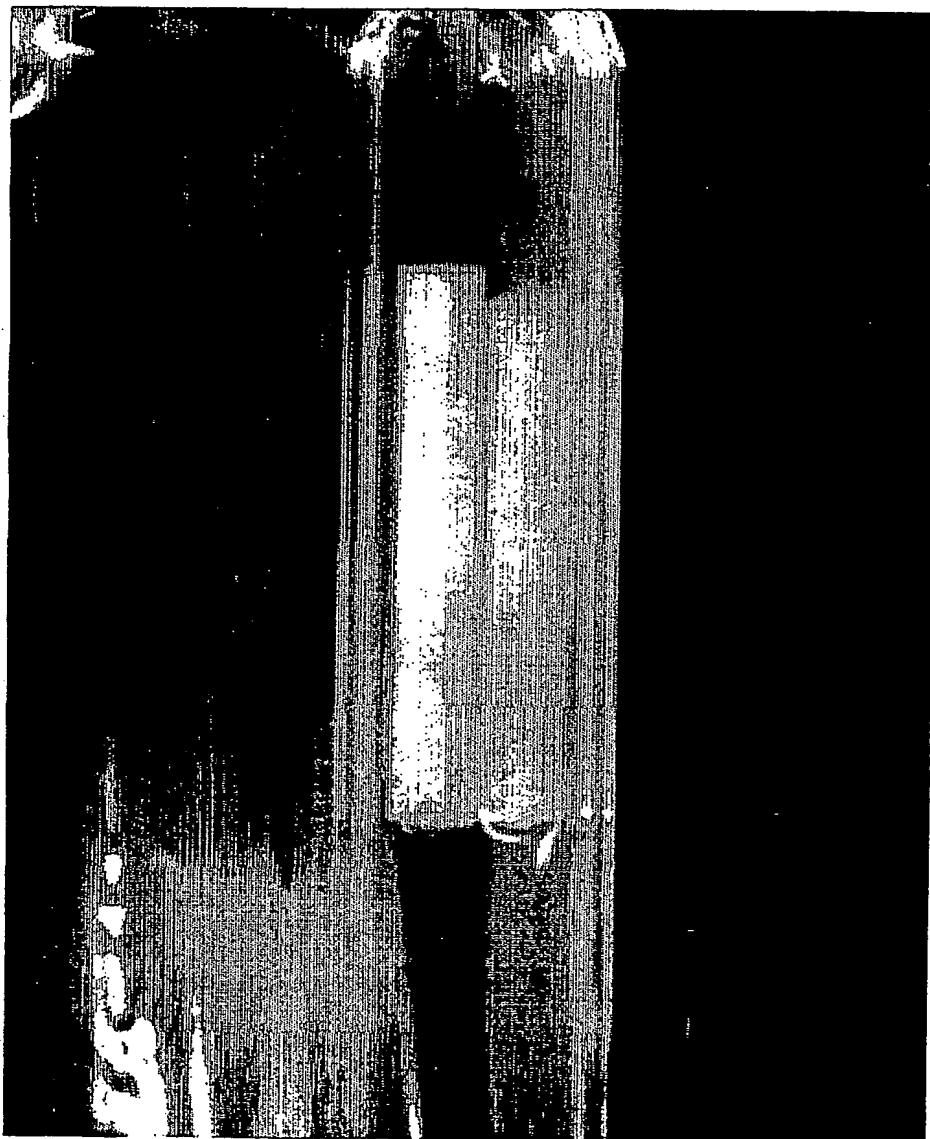


☒ 1 3



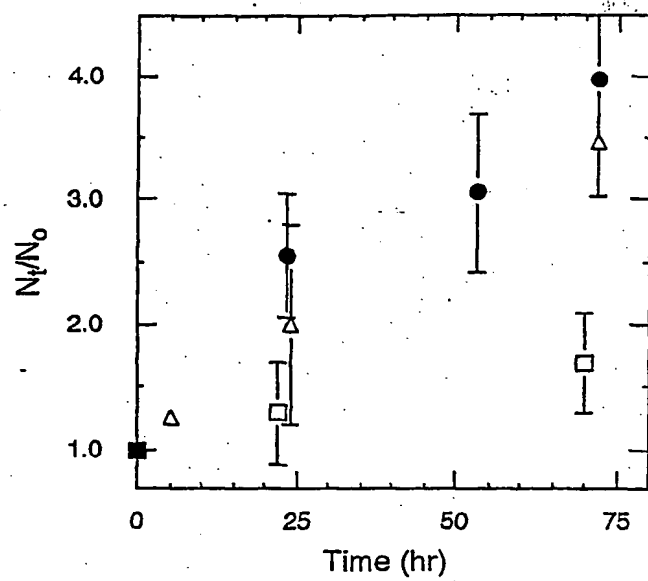
☒ 1 4

14/15



15/15

図 15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05275

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08H1/06, C08L89/06, A61L27/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08H1/00-1/06, C08L89/00-89/06, A61L27/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-33661 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 06 February, 1996 (06.02.96), Claims; examples (Family: none)	1-10, 13-15, 18
X	JP 9-173361 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 08 July, 1997 (08.07.97), Claims; Par. No. [0011]; examples (Family: none)	1-10, 13-15, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 September, 2002 (02.09.02)Date of mailing of the international search report  
17 September, 2002 (17.09.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05275

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 89/00413 A1 (STONE, Kevin, R.) 26 January, 1989 (26.01.89), Claims and examples</p> <p>&amp; WO 90/09769 A1                      &amp; WO 91/16867 A &amp; WO 93/11723 A1                      &amp; EP 527936 A &amp; WO 93/21857 A1                      &amp; EP 461201 A &amp; WO 95/32623 A1                      &amp; EP 760598 A &amp; EP 324852 A                          &amp; EP 617598 A &amp; EP 639959 A                          &amp; US 4880429 A1 &amp; US 5007934 A1                      &amp; US 5108438 A1 &amp; US 5116374 A1                      &amp; US 5158574 A1 &amp; US 5258043 A1                      &amp; US 5263984 A1 &amp; US 5306311 A1                      &amp; US 5624463 A1 &amp; US 5681353 A1                      &amp; US 5735902 A1 &amp; US 5735903 A1                      &amp; US 6042610 A1 &amp; JP 2-500654 A                      &amp; JP 4-504968 A &amp; JP 5-508333 A                      &amp; JP 6-507659 A &amp; JP 7-505326 A                      &amp; JP 3100156 B &amp; JP 10-501155 A                      &amp; AU 7959191 A &amp; DE 69126974 D                      &amp; AU 5337990 A &amp; DE 69021204 C                      &amp; AU 2424588 A &amp; DE 3879921 D                      &amp; AU 3229193 A &amp; AU 2555395 A                      &amp; AU 4048493 A &amp; CA 2050471 A                      &amp; CA 2082427 A &amp; AT 87452 T                          &amp; DE 3879921 A &amp; AU 637605 B                      &amp; CA 2125967 A &amp; DE 3879921 T                      &amp; CA 2134111 A &amp; AT 125441 T                      &amp; ES 2077676 T &amp; AU 669686 B                      &amp; AT 155668 T &amp; AU 684183 B</p>	1-10, 13-15 18
A	<p>JP 9-273080 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 21 October, 1997 (21.10.97), Claims (Family: none)</p>	1-15, 18-22
A	<p>WO 96/34618 A (Protein Polymer Technologies, Inc.), 07 November, 1996 (07.11.96), Claims</p> <p>&amp; EP 823848 A                          &amp; US 5817303 A1 &amp; US 6033654 A1                      &amp; AU 823848 A &amp; CA 2219020 A                      &amp; AU 692391 B &amp; NZ 307794 A                          &amp; BR 9608132 A &amp; JP 11-502537 A</p>	1-15, 18-22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05275

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16-17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16 and 17 relate to surgical therapy or regeneration therapy and thus pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods. Thus, these claims relate to a subject matter which this International Searching Authority (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 18 and 21 and 22 relate to crosslinked elastin.

Claims 19 and 20 relate to crosslinking agents.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/05275

Continuation of Box No. I-1 of continuation of first sheet (1)

is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08H1/06, C08L89/06, A61L27/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08H1/00-1/06, C08L89/00-89/06, A61L27/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 8-33661 A (住友ベークライト株式会社) 1996.02.06, 特許請求の範囲及び実施例 (ファミリーなし)	1-10, 13-15, 18
X	JP 9-173361 A (住友ベークライト株式会社) 1997.07.08, 特許請求の範囲、段落【0011】及び実 施例 (ファミリーなし)	1-10, 13-15, 18

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.09.02

国際調査報告の発送日

17.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小野 寺 務

4J 8118



電話番号 03-3581-1101 内線 3455

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 89/00413 A1 (STONE, Kevin, R.) 1989. 01. 26, Claims and Examples &WO 90/09769 A1 &WO 91/16867 A &WO 93/11723 A1 &EP 527936 A &WO 93/21857 A1 &EP 461201 A &WO 95/32623 A1 &EP 760598 A &EP 324852 A &EP 617598 A &EP 639959 A &US 4880429 A1 &US 5007934 A1 &US 5108438 A1 &US 5116374 A1 &US 5158574 A1 &US 5258043 A1 &US 5263984 A1 &US 5306311 A1 &US 5624463 A1 &US 5681353 A1 &US 5735902 A1 &US 5735903 A1 &US 6042610 A1 &JP 2-500654 A &JP 4-504968 A &JP 5-508333 A &JP 6-507659 A &JP 7-505326 A &JP 3100156 B &JP 10-501155 A &AU 7959191 A &DE 69126971 D &AU 5337990 A &DE 69021204 C &AU 2424588 A &DE 3879921 D &AU 3229193 A &AU 2555395 A &AU 4048493 A &CA 2050471 A &CA 2082427 A &AT 87452 T &DE 3879921 A &AU 637605 B &CA 2125967 A &DE 3879921 T &CA 2134111 A &AT 125441 T &ES 2077676 T &AU 669686 B &AT 155668 T &AU 684183 B	1-10, 13-15, 18
A	JP 9-273080 A (昭和電工株式会社) 1997. 10. 21, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-15, 18-22
A	WO 96/34618 A (PROTEIN POLYMER TECHNOLOGIES, INC.) 1996. 11. 07, Claims &EP 823848 A &US 5817303 A1 &US 6033654 A1 &AU 823848 A &CA 2219020 A &AU 692391 B &NZ 307794 A &BR 9608132 A &JP 11-502537 A	1-15, 18-22

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲16及び17は、外科治療方法ないし再生医療であり、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-18及び21-22は、エラスチン架橋体に関するものである。  
請求の範囲19-20は、架橋剤に関するものである。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**